

" PEPTIDES POSSÉDANT NOTAMMENT UNE ACTIVITÉ ANTI-ANGIOGÉNIQUE ET LEURS  
APPLICATIONS EN THÉRAPEUTIQUE "

L'invention se rapporte à des peptides possédant notamment une activité anti-angiogénique et à leurs applications en thérapeutique.

Les recherches des inventeurs concernant des peptides thérapeutiquement actifs les ont amené à élaborer des constructions qui se sont révélées de grand intérêt au regard de leurs propriétés anti-angiogéniques.

L'invention vise donc de tels peptides et la mise à profit de leurs propriétés thérapeutiques pour élaborer des médicaments. Elle vise ainsi les compositions pharmaceutiques renfermant ces peptides à titre de principe actif. Elle vise également l'utilisation de ces peptides pour fabriquer des médicaments à effet anti-angiogénique, pour le traitement de pathologies liées à une hypervascularisation.

Les peptides selon l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de peptides cyclisés, répondant à la séquence

SEQ ID N°1 :  $X_1X_2RGDX_3FGX_4X_5LLFIHFX_6IGSX_7HSX_8IX_9$

dans laquelle :

- les lettres sans indice numérique correspondent aux acides aminés définis par le code international à une lettre.
- $X_1$  est soit un G soit un GG dont l'extrémité amino-terminale est libre, alkylée, acylée, notamment acétylée, ou comporte un groupe de marquage comme le groupe biotinyle,
- $X_2$  est soit un C, auquel cas  $X_2 = X_4$ , les 2 C étant alors réunis par un pont disulfure, ou  $X_2$  est capable de former un pont lactame avec  $X_4$ , l'un de  $X_2$  ou  $X_4$  étant un acide aminé porteur d'un groupement acide, comme A ou D, l'autre portant une fonction aminée, comme Q, N.

- X<sub>3</sub> est soit un motif M, soit un motif nor-Leucine
- X<sub>5</sub> est soit un motif, soit une succession de deux motifs di-, tri- ou tetra-peptidiques composée de G ou d'une combinaison de G et de S, comme GG, GGG, GGGG, GGS, GGGS, GGS GGS, ou encore X<sub>5</sub> est un motif C dont la chaîne latérale (fonction thiol) sert de point de liaison covalente avec un groupe 3-nitro-2-pyridinesulfényle (Npys; Drijfhout et al., 1988 Int J Peptide protein Res, 32:161-166) situé sur l'extrémité N-terminale de l'acide aminé suivant (L),
- X<sub>6</sub> est soit un motif R, soit un motif K
- X<sub>7</sub> est soit un motif R, soit un motif K
- X<sub>8</sub> est soit un motif R, soit un motif K
- X<sub>9</sub> est un acide aminé aliphatique (comme G, ou A) dont l'extrémité C-terminale est amidée.

Ces peptides comportent de 25 à 35 acides aminés.

Un peptide de ce type répond à la séquence

SEQ ID N°2 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHFRIGSRHSRIG (\*indique un pont disulfure reliant les deux motifs C).

D'autres peptides sont tels que définis ci-dessus et présentent un groupe alkylé à leur extrémité N-terminale.

Dans d'autres peptides encore, un ou plusieurs acides aminés sont remplacés par leur forme dextrogyre (Daa).

D'autres peptides selon l'invention répondent à la SEQ ID N°1 ci-dessus, mais comportent une ou plusieurs liaisons peptidiques pour former des bioisostères. On citera par exemple la réduction d'un pont amide en -CH<sub>2</sub>NH-, ou une réaction de rétro-inverso, tels que définis par Goodman et Ro (1995, dans Burger's Medicinal Chemistry. Fifth ed vol.1 pages 803-861, édité par ME Wolff).

Comme variants du peptide de séquence SEQ ID N°2 exposant le motif RGD par un pont disulfure entre deux cystéines, on citera les peptides de séquences SEQ ID N°3 à 10:

SEQ ID N°3 : GG\*CRGDMFG\*CGLLRIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°4 : GG\*CRGDMFG\*CGG-LFIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°5 : GG\*CRGDMFG\*CGSLFIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°6 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHFKIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°7 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHF<sup>N</sup>RIGSRHSRIG (<sup>N</sup>R représentant un motif N-alkylarginine)  
 SEQ ID N°8 : GG\*CRGDMFG\*CGLLSRHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°9 : GG\*CRGDMFG\*CGLLSIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°10 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFRHFRIGSRHSRIG

D'autres peptides de l'invention comportent une séquence  
 SEQ ID N°11 : X-R-G-D-M-F-GX'  
 exposant le motif RGD par un pont lactame entre les acides aminés X (X)-C-O-NH-(X'), X et X' étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine.

Des peptides préférés de ce groupe répondent aux séquences  
 SEQ ID N°12 à SEQ ID N°23 :

SEQ ID N°12 : GGXRGDMFGX'GLLFIHFRIGCRHSRIG  
 SEQ ID N°13 : GGXRGDMFGX'GLLFIFFRIGCRFSRIG  
 SEQ ID N°14 : GGXRGDMFGX'GLLFIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°15 : GGXRGDMFGX'GLLRIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°16 : GGXRGDMFGX'GG-LFIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°17 : GGXRGDMFGX'GSLFIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°18 : GGXRGDMFGX'GLLFIHFKIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°19 : GGXRGDMFGX'GLLFIHF<sup>N</sup>RIGSRHSRIG (<sup>N</sup>R représentant un motif N-alkylarginine)  
 SEQ ID N°20 : GGXRGDMFGX'GLLSRHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°21 : GGXRGDMFGX'GLLSIHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°22 : GGXRGDMFGX'GLLFRHFRIGSRHSRIG  
 SEQ ID N°23 : GGXRGDMFGX'GLLFIHFRIGSRHSRIG

Lesdites séquences peuvent être modifiées, c'est-à-dire correspondre au peptide natif mais comporter un ou plusieurs

acides différents, modifiés chimiquement, des lors que ces modifications n'affecte pas la fonction recherchée. On citera notamment le remplacement de Met par nor-Leu, Arg par N-alkyl Arg, qui permet en particulier de stabiliser la construction. Ces modifications comprennent également un groupe acyle, notamment acétyle en N-terminal.

Les peptides de l'invention sont encore caractérisés en ce qu'ils induisent l'apoptose de cellules endothéliales humaines exprimant les récepteurs  $\alpha\text{V}\beta 3$ .

Ils sont en outre avantageusement caractérisés en ce qu'ils subissent une endocytose par des cellules endothéliales humaines exprimant les récepteurs  $\alpha\text{V}\beta 3$ , se localisent au niveau du compartiment mitochondrial et exercent un effet mitochondriotoxique.

Lorsqu'on met en contact un peptide tel qu'élaboré ci-dessus, ou tel que défini ci-dessus, avec des cellules endothéliales, on observe une reconnaissance spécifique des intégrines  $\alpha\text{V}\beta 3$  à la surface des cellules endothéliales, ce qui permet l'endocytose du peptide chimère. Une fois internalisé, le peptide se localise transitoirement dans les lysosomes, comme montré en microscopie confocale et se distribue progressivement dans le compartiment mitochondrial.

On notera que la spécificité des peptides de l'invention résulte de l'ajout de la partie mitochondrio-toxique à des ligands des intégrines pour exercer une toxicité par la voie de la mitochondrio-toxicité, les ligands des intégrines étant présents à des fins de ciblage et n'ayant pas eux-mêmes d'activité angiostatique.

Comme illustré par les exemples donnés ci-après, le traitement de cellules endothéliales primaires humaines avec des doses de peptides de l'ordre du micromolaire conduit à une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\psi\text{m}$ ), à la libération de cytochrome c mitochondrial, à l'exposition

de phosphatidyl-sérine et à la condensation de chromatine nucléaire.

Ces constructions peptidiques présentent l'avantage d'une absence de toxicité sur les cellules  $\alpha\text{V}\beta 3$  négatives.

L'invention vise donc également la mise à profit de ces propriétés pour induire sélectivement PMM et l'apoptose de cellules endothéliales angiogéniques dans le cadre de stratégies thérapeutiques, notamment anti-cancer, traitement de la polyarthrite, de la rétinopathie diabétique.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un peptide, tel que défini ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Ces compositions se présentent avantageusement sous les formes galéniques appropriées pour leur administration par voie injectable.

On citera en particulier les solutions injectables destinées à une administration par voie intra veineuse.

L'invention vise en outre l'utilisation de constructions peptidiques telles que définies ci-dessus pour fabriquer des médicaments anti-angiogéniques pour le traitement de pathologies dues à une hypervascularisation.

On citera en particulier le traitement de tumeurs solides telles que les tumeurs pulmonaires, les adénomes, les mélanomes, les cancers de la prostate, du sein, du colon, du pancréas, les ostéosarcomes. L'invention s'applique également au traitement de rétinopathies diabétiques et de polyarthrites.

Les posologies des formes d'administration et les traitements seront déterminés par l'homme du métier en fonction de la pathologie à traiter et de l'état du patient.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent se rapportant à la construction SEQ ID N°2 ( ci-après TEAM-VP)

SEQ ID N°2 : GG\*CRGDMFG\*C-GG-LLFIHFRIGSRHSRIG-amide

avec ou sans biotine, "\*" indiquant une cyclisation par formation d'un pont disulfure. Il sera fait référence aux figures 1 à 3, qui représentent, respectivement,

- la figure 1, l'analyse de la cytotoxicité sur des cellules endothéliales,
- la figure 2, la reconnaissance du motif CycRGD par les intégrines  $\alpha V\beta 3$ ,
- la figure 3, les effets de TEAM-VP sur des mitochondries isolées et des cellules HUVEC.

Exemples :

#### **Analyse de la cytotoxicité de TEAM-VP sur cellules endothéliales**

- a. Les cellules HUVEC ont été incubées pendant 24h avec 5-30  $\mu$ M de peptide CycRGD, LLFIHFRIGSRHSRIG-amide (C4) ou TEAM-VP, puis marquées avec la 7-AAD et analysées par cytométrie en flux (Figure 1a).
- b. Les cellules HUVEC ont été incubées pendant 24, 48, 72 et 96h avec 15  $\mu$ M de TEAM-VP puis marquées avec la 7-AAD et analysées par cytométrie en flux (Figure 1b).

#### **Reconnaissance du motif CycRGD par les intégrines $\alpha V\beta 3$**

##### **a. Analyse de la liaison cellulaire :**

Les cellules HUVEC ont été incubées pendant 45 min à température ambiante avec les peptides suivants : GGCRGDMFGCGG-amide (RGD linéaire), GG\*CRADMFG\*CGG-amide (CycRAD) et GG\*CRGDMFG\*CGG-amide (CycRGD) (0,5 à 2  $\mu$ M) marqués FITC et analysées par cytométrie en flux (Figure 2a).

##### **b. Chasse du peptide CycRGD par lui-même:**

Les cellules HUVEC ont été pré-incubées ou non pendant 30 min à température ambiante avec 200  $\mu$ M de peptide CycRGD non marqué avant ajout de peptide FITC-CycRGD (10  $\mu$ M) pendant 45 min et analysées par cytométrie en flux (Figure 2b).

c. Compétition pour les sites intégrines.:

Les cellules HUVEC ont été pré-incubées ou non pendant 30 min à température ambiante avec 25  $\mu$ M de peptide CycRGD, CycRAD, GRGDS et GRGES avant ajout de peptide FITC-CycRGD (0,5  $\mu$ M), puis analysées par cytométrie en flux (Figure 2c).

d. Corrélation entre expression des intégrines, liaison et toxicité des peptides :

Les cellules HUVEC, HMVECd, MCF-7, MDA, HeLa, HT-29, Jurkat, CEM et PBMC ont été marquées avec les anticorps dirigés contre les intégrines  $\alpha$ V $\beta$ 3 et  $\alpha$ V $\beta$ 5 et analysées par cytométrie en flux. La liaison du peptide CycRGD et l'induction d'apoptose par TEAM-VP sur les différents types cellulaire ont été mesurées (Figure 2d).

+ Etude du processus d'entrée des peptides :

Les peptides FITC-CycRGD et TEAM-VP (FITC) rentrent dans les HUVEC et co-localisent avec les billes de dextran (5h de co-traitement). L'entrée de TEAM-VP et des billes de dextran est inhibée par le traitement Azide de sodium + Déoxyglucose, indiquant une entrée du peptide par endocytose. On n'observe pas d'entrée du peptide FITC-CycRAD dans les HUVEC, ni d'entrée du peptide FITC-CycRGD dans les HeLa.

+ Routage intracellulaire de TEAM-VP :

On observe au confocal des HUVEC traitées avec TEAM-VP pendant 8, 24 et 32h.

TEAM-VP révélé avec la Streptavidine-Texas Red co-distribue avec les lysosomes (anti-Lamp2-FITC) à 8h de traitement et semblerait quitter ces organelles à 24h. TEAM-VP révélé avec la Streptavidine-FITC co-distribue partiellement avec les mitochondries (anti-VDAC) à 24h et totalement à 32h. On

n'observe pas de co-distribution avec l'appareil de Golgi (anti-Golgin) tout au long du traitement.

### **Effets de TEAM-VP sur des mitochondries isolées et des cellules HUVEC**

#### a. Effet sur les mitochondries isolées :

##### Induction du gonflement mitochondrial :

Les mitochondries isolées ont été incubées avec le peptide CycRGD ou TEAM-VP en présence ou non d'acide bongkréique (BA, 50  $\mu$ M), de cyclosporine A (CsA, 10  $\mu$ M), et de DIDS (8  $\mu$ M).

##### Induction de la chute de potentiel membranaire mitochondrial :

Les mitochondries isolées ont été incubées avec 1  $\mu$ M de TEAM-VP ou ses contrôles (C1, C2, C3), marquées au JC-1 et analysées en cytométrie de flux (Figure 3a),

SEQ ID N°24 : C1= GG\*CRADMFG\*CGLLFIHFRIGSRHSRIGamide

SEQ ID N°25 : C1= GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHFAIGSRHSAIGamide

SEQ ID N°26 : C3= RKKRRQRRRGLLFIHFRIGSRHSRIGamide

#### b. Relargage de cytochrome c :

Les mitochondries isolées ont été incubées avec l'Alaméthicine (5  $\mu$ g/ml) ou TEAM-VP (10  $\mu$ M) et le surnageant analysé en Western Blot avec un anti-cytochrome c (Figure 3b).

#### c. Analyse de l'apoptose nucléaire :

Les cellules HUVEC traitées avec TEAM-VP (15-40  $\mu$ M) en présence ou non d'inhibiteur de caspases pendant 8, 16, 24 et 48h ont été marquées au Hoechst et observées au microscope inversé. Les pourcentages de cellules présentant des noyaux intacts, de stade I ou de stade II sont reportés (Figure 3c).

#### d. Induction de la chute de potentiel membranaire mitochondrial et exposition des phosphatidyl sérines in cellula :

Les cellules HUVEC ont été incubées pendant 24h avec 15  $\mu$ M de peptide TEAM-VP, CycRGD et C4 puis marquées au JC-1 ou avec



un anti-PARP ou à l'Annexin-V-FITC et analysées par cytométrie en flux (Figure 3d).

+ Relargage cytochrome C in cellula:

Relargage de cytochrome c observé en microscopie après 24h de traitement avec TEAM-VP (10  $\mu$ M) et double marquage des cellules fixées avec un anti-cytochrome c et un anti-VDAC.

+ Chute de potentiel membranaire mitochondrial in cellula:

Chute de potentiel observée au microscope après marquage au JC-1 des cellules HUVEC traitées pendant 16-24h avec 15  $\mu$ M de peptide TEAM-VP.

Modèles animaux :

Les modèles animaux mis en œuvre pour démontrer l'efficacité des produits correspondent à ceux classiquement utilisés (voir notamment Kisher et al., 2001 Cancer Research 61:7669-7674, Galaup et al., 2003 Mol Therapy 7:731-740).

REVENDICATIONS

1. Peptides possédant notamment une activité anti-angiogénique, caractérisés en ce qu'il s'agit de peptides cyclisés, répondant à la séquence

SEQ ID N°1 :  $X_1X_2RGDX_3FGX_4X_5LLFIHFX_6IGSX_7HSX_8IX_9$

dans laquelle :

- les lettres sans indice numérique correspondent aux acides aminés définis par le code international à une lettre.
  - $X_1$  est soit un G soit un GG dont l'extrémité amino-terminale est libre, alkylée, acylée, notamment acétylée, ou comporte un groupe de marquage comme le groupe biotinyne,
  - $X_2$  est soit un C, auquel cas  $X_2 = X_4$ , les 2 C étant alors réunis par un pont disulfure, ou  $X_2$  est capable de former un pont lactame avec  $X_4$ , l'un de  $X_2$  ou  $X_4$  étant un acide aminé porteur d'un groupement acide, comme A ou D, l'autre portant une fonction aminée, comme Q, N.
  - $X_3$  est soit un motif M, soit un motif nor-Leucine
  - $X_5$  est soit un motif, soit une succession de deux motifs di-, tri- ou tetra-peptidiques composée de G ou d'une combinaison de G et de S, comme GG, GGG, GGGG, GGS, GGGS, GSGGS, ou encore  $X_5$  est un motif C dont la chaîne latérale (fonction thiol) sert de point de liaison covalente avec un groupe 3-nitro-2-pyridinesulfényle situé sur l'extrémité N-terminale de l'acide aminé suivant (L).
  - $X_6$  est soit un motif R, soit un motif K
  - $X_7$  est soit un motif R, soit un motif K
  - $X_8$  est soit un motif R, soit un motif K
- $X_9$  est un acide aminé aliphatique (comme G, ou A) dont l'extrémité C-terminale est amidée.

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence

SEQ ID N°2 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHFRIGSRHSRIG (\*indique un pont disulfure reliant les deux motifs C).

3. Peptides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils sont modifiés par rapport au peptide natif et présentent notamment un groupe alkylé à leur extrémité N-terminale et/ou en ce qu'un ou plusieurs acides aminés sont remplacés par leur forme dextrogyre (Daa) et/ou en ce qu'ils comportent une ou plusieurs liaisons peptidiques pour former des bioisostères, par exemple la réduction d'un pont amide en -CH<sub>2</sub>NH-, ou une réaction de rétro-inverso.

4. Peptides selon la revendication 2, dans lesquels le motif RGD est exposé par un pont disulfure entre deux cystéines, en particulier les peptides de séquences SEQ ID N°3 à 10:

SEQ ID N°3 : GG\*CRGDMFG\*CGLLRIHFRIGSRHSRIG

SEQ ID N°4 : GG\*CRGDMFG\*CGG-LFIHFRIGSRHSRIG

SEQ ID N°5 : GG\*CRGDMFG\*CGGSLFIHFRIGSRHSRIG

SEQ ID N°6 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHFKIGSRHSRIG

SEQ ID N°7 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFIHF<sup>N</sup>RIGSRHSRIG (<sup>N</sup>R représentant un motif N-alkylarginine)

SEQ ID N°8 : GG\*CRGDMFG\*CGLLSRHFRIGSRHSRIG

SEQ ID N°9 : GG\*CRGDMFG\*CGLLSIHFRIGSRHSRIG

SEQ ID N°10 : GG\*CRGDMFG\*CGLLFRHFRIGSRHSRIG

5. Peptides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence

SEQ ID N°11 : X-R-G-D-M-F-G-X'

exposant le motif RGD par un pont lactame entre les acides aminés X (X)-C-O-NH-(X'), X et X' étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine.

6. Peptides selon la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils répondent aux séquences SEQ ID N°12 à SEQ ID N°23 :

SEQ ID N°12 : GGXRGDMFGX'GGLLFIHFRIGCRHSRIG  
SEQ ID N°13 : GGXRGDMFGX'GGLLFIFFRIGCRFSRIG  
SEQ ID N°14 : GGXRGDMFGX'GGLLFIHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°15 : GGXRGDMFGX'GGLLRIHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°16 : GGXRGDMFGX'GG-LFIHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°17 : GGXRGDMFGX'GGS�FIHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°18 : GGXRGDMFGX'GGLLFIHFKIGSRHSRIG  
SEQ ID N°19 : GGXRGDMFGX'GGLLFIHF<sup>N</sup>RIGSRHSRIG (<sup>N</sup>R représentant un motif N-alkylarginine)  
SEQ ID N°20 : GGXRGDMFGX'GGLLSRHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°21 : GGXRGDMFGX'GGLLSIHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°22 : GGXRGDMFGX'GGLLFRHFRIGSRHSRIG  
SEQ ID N°23 : GGXRGDMFGX'GGLLFIHFRIGSRHSRIG

7. Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisés qu'ils induisent l'apoptose de cellules endothéliales humaines exprimant les récepteurs  $\alpha\text{V}\beta 3$ .

8. Peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisés en ce qu'ils subissent une endocytose par des cellules endothéliales humaines exprimant les récepteurs  $\alpha\text{V}\beta 3$ , se localisent au niveau du compartiment mitochondrial et exercent un effet mitochondriotoxique.

9. Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un peptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 9, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous les formes galéniques appropriées pour leur administration par voie injectable, en particulier sous forme de solutions injectables destinées à une administration par voie intra veineuse.

11. Utilisation de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour fabriquer des médicaments anti-

angiogéniques pour le traitement de pathologies dues à une hypervascularisation.

12. Utilisation selon la revendication 11, pour la fabrication de médicaments pour le traitement de tumeurs solides telles que les tumeurs pulmonaires, les adénomes, les mélanomes, les cancers de la prostate, du sein, du colon, du pancréas, les ostéosarcomes, le traitement de rétinopathies diabétiques et de polyarthrites.

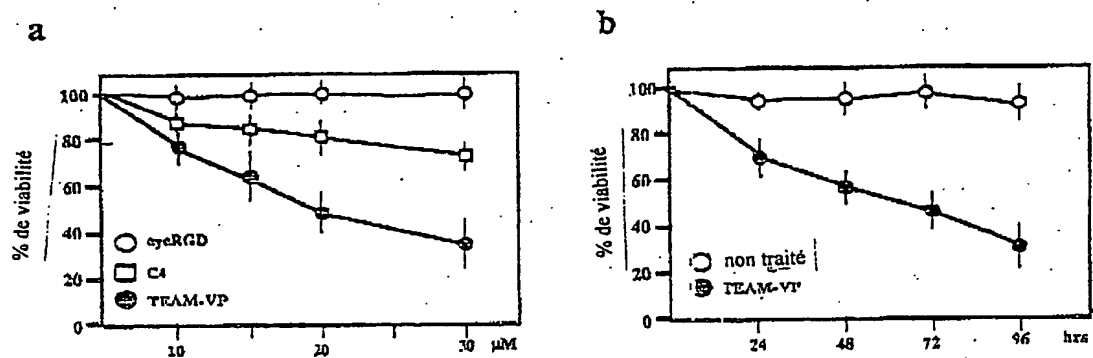


Figure 1

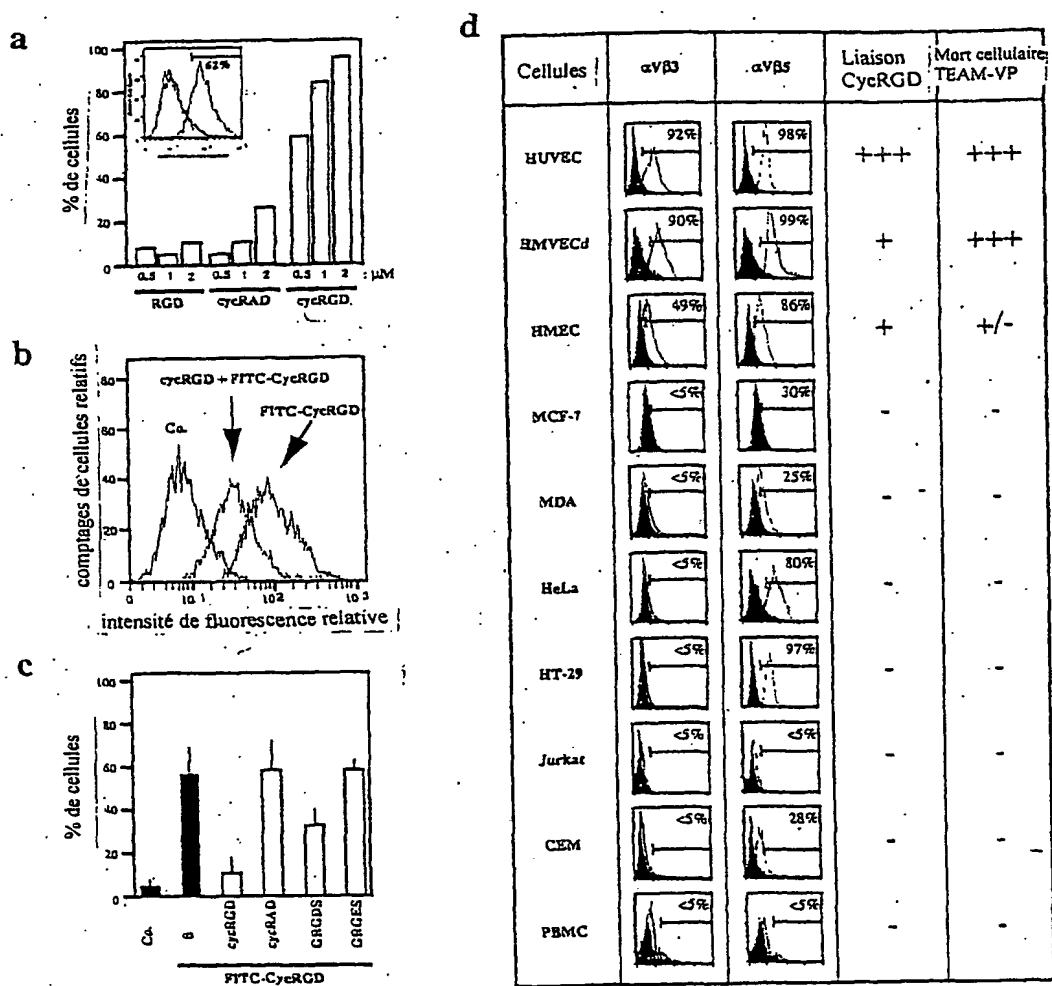


Figure 2

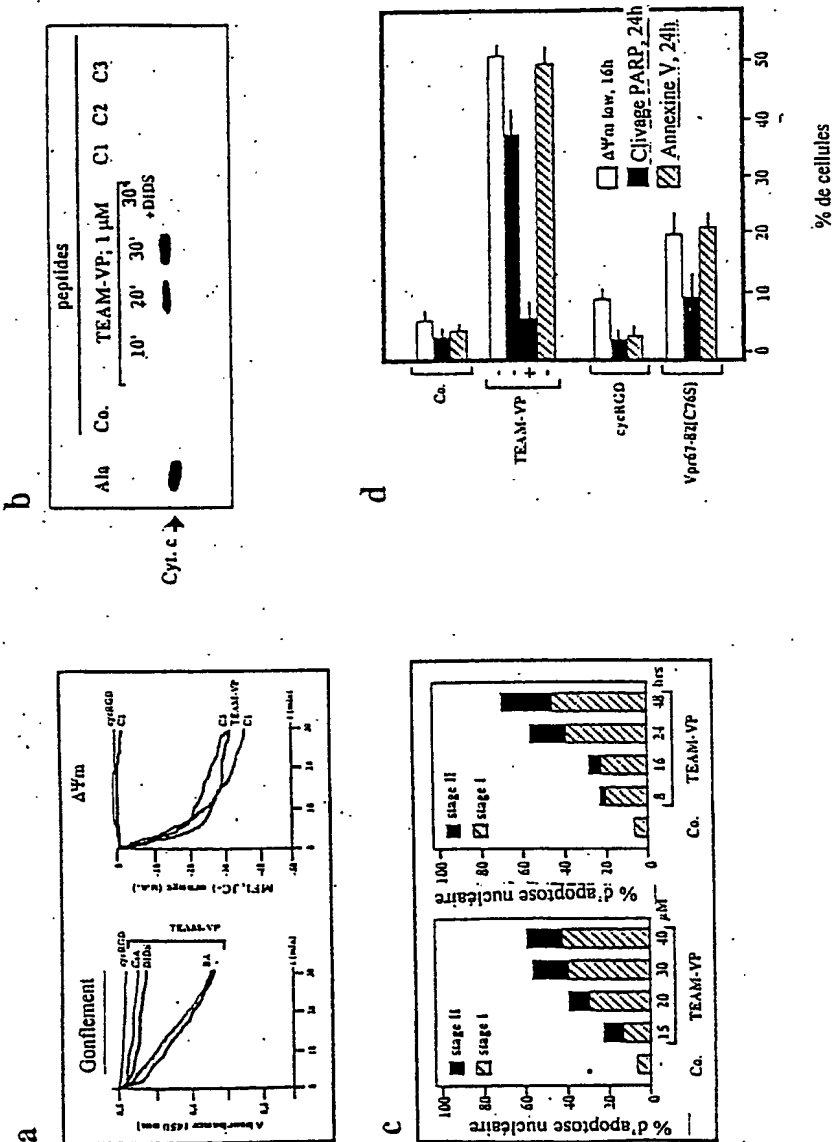


Figure 3



## SEQUENCE LISTING

<110> THERAPTOSIS S.A.

<120> "Peptides possédant notamment une activité anti-angiogénique et leurs applications en thérapeutique"

<130> CP/61114-PCT

<150> FR 02 11 270

<151> 2003-09-25

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> soit un G soit un GG dont l'extrémité amino-terminale est libre, alkylée, acylée, notamment acétylée, ou comporte un groupe de marquage comme le groupe biotinyne.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> soit un C, auquel cas X en position 2 = X en 9, les 2 C étant alors réunis par un pont disulfure, ou X en 2 est capable de former un pont lactame avec X en 4, l'un de X en 2 ou X en 9 étant un acide aminé porteur d'un groupement acide, comme A ou D, l'autre portant une fonction aminée, comme Q, N.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> soit un C, auquel cas X en position 2 = X en 9, les 2 C étant alors réunis par un pont disulfure, ou X en 2 est capable de former un pont lactame avec X en 9, l'un de X en 2 ou X en 9 étant un acide aminé porteur d'un groupement acide, comme A ou D, l'autre portant une fonction aminée, comme Q, N.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> soit un C, auquel cas X en position 2 = X en 9, les 2 C étant alors réunis par un pont disulfure, ou X en 2 est capable de former un pont lactame avec X en 4, l'un de X en 2 ou X en 9 étant un acide aminé porteur d'un groupement acide, comme A ou D, l'autre portant une fonction aminée, comme Q, N.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> soit un motif R, soit un motif K

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> soit un motif R, soit un motif K

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> soit un motif R, soit un motif K

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> est un acide aminé aliphatique dont l'extrémité C-terminale est amidée.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> soit un motif M, soit un motif nor-Leucine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> soit un motif, soit une succession de deux motifs di-, tri- ou tetra-peptidiques composée de G ou d'une combinaison de G et de S, comme GG, GGG, GGGG, GGS, GGGS, GGS GGS, ou encore X en 5 est un motif C dont la chaîne latérale sert de point de liaison covalente avec un groupe 3-nitro-2-pyridinesulfényle ...

<400> 1

Xaa Xaa Arg Gly Asp Xaa Phe Gly Xaa Xaa Leu Leu Phe Ile His Phe  
1 5 10 15

Xaa Ile Gly Ser Xaa His Ser Xaa Ile Xaa  
20 25

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<400> 2

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<400> 3

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Arg Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<400> 4

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Phe Ile His  
1 5 10 15

Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 5

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<400> 5

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Ser Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<400> 6

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Lys Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (19)..(19)

&lt;223&gt; NR représentant un motif N-alkylarginine

&lt;400&gt; 7

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Asn Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human VIH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; .DISULFID

&lt;222&gt; (3)..(10)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 8

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Ser Arg  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human VIH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFID

&lt;222&gt; (3)..(10)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 9

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Ser Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human VIH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFID

&lt;222&gt; (3)..(9)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 10

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Phe Arg  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human VIH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1)..(1)

<223> le motif RGD par un pont lactame entre les acides aminés X (X)-C-  
O-NH-(X'), X et X' étant des acides aminés tels que l'un porte un  
groupe acide, et l'autre porte une amine

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> le motif RGD par un pont lactame entre les acides aminés X (X)-C-O-NH-(X'), X et X' étant des acides aminés tels que l'un porte un groupe acide, et l'autre porte une amine

<400> 11

Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa  
1 5

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 12

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 13

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>



<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 13

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

Phe Phe Arg Ile Gly Cys Arg Phe Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 14

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 15

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 15

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Arg Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 16

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Phe Ile His  
1 5 10 15

Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 17

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Ser Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> x en 3 et x en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> x en 3 et x en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 18

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Lys Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> x en 3 et x en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> NR représentant un motif N-alkylarginine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 19

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 20

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Ser Arg  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 21

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Ser Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 22

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Arg  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un  
groupement acide, et l'autre porte une amine

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> X en 3 et X en 10 étant des acides aminés tels que l'un porte un  
groupement acide, et l'autre porte une amine

<400> 23

Gly Gly Xaa Arg Gly Asp Met Phe Gly Xaa Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 24

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (28)..(28)

<223> AMIDATION

<400> 24

Gly Gly Cys Arg Ala Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 25

<211> 28

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (28)..(28)

<223> AMIDATION

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<400> 25

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly Leu Leu Phe Ile  
1 5 10 15

His Phe Ala Ile Gly Ser Arg His Ser Ala Ile Gly  
20 25

<210> 26

<211> 27



<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> AMIDATION

<400> 26

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Leu Leu Phe Ile His  
1 5 10 15

Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
20 25

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223>

<400> 27

Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly Ser Arg His Ser Arg Ile Gly  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223>

<400> 28

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly  
1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223>

<400> 29

Gly Gly Cys Arg Ala Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly  
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Human VIH

<220>

<221> DISULFID

<222> (3)..(10)

<223>

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223>

<400> 30

Gly Gly Cys Arg Gly Asp Met Phe Gly Cys Gly Gly  
1 5 10